

Diplôme d'Etudes Approfondies de Ressources Phytogénétiques et Interactions biologiques

Ecole Doctorale Biologie Intégrative

Contribution à la méthodologie de conservation
d'une espèce forestière menacée, *Aniba
rosaeadora* DUCKE.

Etienne Cédric

responsable de stage : Jean-Marc Bouvet

CIRAD- Forêt, arbres et plantations,
TA 10/C, campus international de
Baillarguet, 34398 Montpellier

Soutenu à Montpellier
Le 31 Août 2001

RESUMES

Aniba rosaeadora (le Bois de Rose) est un arbre tropical originaire d'Amérique du Sud qui a longtemps été exploité pour sa particularité à produire du linalol. Cet alcool terpénique entre dans la composition de certains produits de parfumerie et confère ainsi à son producteur un potentiel économique très attractif. A tel point que l'espèce semble aujourd'hui menacée de disparition. Le CIRAD-Forêt a choisi de privilégier une double approche pour répondre à cette urgence, combinant à la fois les méthodologies de conservation *in* et *ex situ*. Ce stage de DEA rentre dans le cadre de cette stratégie de conservation et tente d'apporter les premiers éléments à sa mise en place. Il porte d'une part sur la caractérisation génétique de populations résiduelles d'origine naturelle et anthropique à l'aide de marqueurs neutres (RAPD et PCR-RFLP) et d'autre part sur l'élaboration d'une « core collection » dont les individus seront sélectionnés sur la base de caractères adaptatifs. Les résultats suggèrent la présence d'une certaine variabilité au sein de cette espèce en Guyane Française ; ils permettent de plus d'élaborer une première « core collection » temporaire, ceci après le choix par la méthode PCSS des 100 individus les plus représentatifs. Les résultats sont discutés, notamment au travers des biais d'échantillonnage et de l'intérêt de combiner polymorphisme neutre et sélectionné pour la conservation. Des perspectives de recherche sont présentées, telle la nécessité d'étendre ce travail à toute l'aire naturelle ou d'intégrer un plus grand nombre de populations naturelles dans la « core collection ».

Mots clés : linalol / conservation *in* et *ex situ* / marqueurs neutres / structuration génétique / « core collection » / PCSS / polymorphisme neutre et sélectionné

Aniba rosaeadora (Rose Wood) is a tropical rain forest tree of south america which has been exploited for a long time for its distinctive characteristic to product linalol. This alcohol is used to elaborate perfumes and give this species an interesting economic potential. After two centuries of strong exploitation, *Aniba rosaeadora* is threatened and emergency actions need to be undertaken. An approach combining *in* and *ex situ* conservation was chosen by CIRAD-forêt to answer this issue. This study tries to introduce first elements for this conservation. Using neutral molecular genetic markers (like RAPD and PCR-RFLP), the genetic structuration of residual populations (natural and anthropic) is estimated ; then a core collection is elaborated with individuals selected on phenotypics traits linked to adaptation. Results suggest that there is a structuration between populations of Rose Wood in French Guyana ; moreover, analyses lead to the establishment of a first temporary core collection based on the choice of the one hundred most representatives individuals by PCSS method. Results are discussed, specially the biais effect in sampling and the interest of combining both neutral and selected polymorphism in conservation. Perspectives of new researches are presented like the necessity to expand the work at the entire natural area and the interest to use a more important number of natural populations to constitute a core collection.

Key words : linalol / *in* and *ex situ* conservation / neutral markers / genetic structuration / core collection / PCSS / neutral and selected polymorphism

REMERCIEMENTS

Ce stage de DEA s'est effectué sous la tutelle du CIRAD-Forêt, au sein du programme « Arbres et Plantations ». La partie pratique s'est déroulée en Guyane Française, au Silvolab de Kourou, groupement d'intérêt scientifique comprenant 10 partenaires dont notamment le CIRAD, l'INRA, l'ENGREF, l'ONF... La partie théorique ainsi que la rédaction ont été réalisées à Montpellier, au campus international de Baillarguet.

Parmi tous les gens que j'ai eu le loisir de côtoyer durant ces 8 derniers mois, je tiens à remercier les personnes suivantes :

Jean-Marc Bouvet, pour m'avoir soumis cette problématique sur le Bois de Rose et pour son appui précieux tout au long de ce périple étudiantin ;

Laurent Maggia, pour son soutien lors de longues et difficiles manipulations de laboratoire ainsi que pour son aide indispensable lors de l'exploitation des résultats ;

Eric Bandou, pour m'avoir offert un appui technique chaque fois que j'en ai eu besoin ;

Marie-Hélène Chevallier, pour m'avoir permis d'utiliser son fond bibliographique ;

Merci également à Roselyne Lannes qui s'est toujours montrée très disponible ;

Enfin, toutes mes pensées pour tous les stagiaires et autres VATs que j'ai eu le loisir de fréquenter ici et là et qui comme moi se posent beaucoup de questions. A tous, merci pour vos réflexions, informations ou autres idées lumineuses...

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>I) Contexte général</u>	1
<u>II) Présentation et objectifs du stage</u>	1
 <u>MATERIELS ET METHODES</u>	2
<u>I) L'espèce <i>Aniba rosaeadora</i></u>	2
<u>II) Les populations résiduelles : aspect pratique et méthodologie moléculaire</u>	3
<u>1) L'échantillonnage</u>	3
<u>2) L'extraction de l'ADN</u>	3
<u>3) L'analyse moléculaire</u>	3
3.1) Les marqueurs moléculaires.....	4
3.1.1) La technique PCR-RFLP.....	4
3.1.2) La technique RAPD.....	4
<u>III) La parcelle conservatoire : aspect pratique et cadre expérimental</u>	5
<u>IV) L'analyse statistique</u>	5
<u>1) L'analyse factorielle</u>	5
<u>2) La représentation arborée</u>	7
<u>3) L'analyse de variance</u>	7
 <u>RESULTATS</u>	8
<u>I) Structuration génétique des populations résiduelles</u>	8
<u>1) Estimation de la diversité chloroplastique par la méthode PCR-RFLP</u>	8
<u>2) Estimation de la diversité totale par la méthode RAPD</u>	8
2.1) L'Analyse Factorielle des Correspondances Multiples.....	9
2.2) La représentation arborée.....	9
2.3) L'analyse de la variance.....	9
<u>II) Création de la « core collection »</u>	10
 <u>DISCUSSION</u>	11
<u>I) Les populations résiduelles</u>	11
<u>II) La « core collection »</u>	12
<u>III) Polymorphisme neutre et polymorphisme sélectionné</u>	13
<u>IV) Perspectives de conservation <i>in</i> et <i>ex situ</i> pour le Bois de Rose</u>	14

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

I) Contexte général

Le monde moderne et la cohorte de ses plaies habituelles mettent en péril l'environnement tel que nous le concevons. Comme le fit si justement remarquer un jour Mostafa Tolba du programme des nations unies pour l'environnement : « si Charles Darwin vivait de nos jours, il est probable que ces travaux ne porteraient pas sur l'origine mais plutôt sur la nécrologie des espèces ». L'homme, sous le fallacieux prétexte du progrès ou parce qu'il néglige ses populations les plus démunies, ne cesse d'empiéter sur les espaces naturels et de piller de manière irresponsable des ressources génétiques indispensables à son développement futur. Parmi celles-ci, les ressources d'origine forestière sont parmi les plus menacées et doivent faire face à des maux tels que la déforestation, la désertification ou encore l'intensification de l'exploitation. La recherche moderne doit ainsi s'impliquer dans ce combat primordial qu'est leur préservation mais plus encore dans celui du maintien de leur diversité. Concept abstrait dont l'une des plus symboliques définitions est celle établie lors de la célèbre convention de Rio, en 1992 (article 2, cité par Linjouom, 2000) : « la diversité biologique est la variabilité des organismes vivants de toute origine, y compris, entre autres, des écosystèmes terrestres, marins, et autres écosystèmes aquatiques et des complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces, ainsi que celle des écosystèmes ». Cette variabilité est à la base de la pérennité d'un système naturel, sa protection la plus efficace contre les aléas extérieurs et les changements environnementaux majeurs.

Ce stage de DEA rentre dans le cadre de la conservation des ressources génétiques forestières, plus exactement dans celle de l'espèce *Aniba rosaeodora* Ducke (de son nom vernaculaire français « le Bois de Rose »). La particularité de cet arbre tropical est la présence au sein des fibres du parenchyme de son bois d'une huile dont le constituant principal est un alcool terpénique nommé linalol (de formule $C_{10}H_{18}O$). Deux variétés sont actuellement distinguées au sein de l'espèce : une première en Guyane Française, qui produit un alcool lévogyre et qui possède de grandes feuilles, et une seconde plus au centre du continent, qui se caractérise quant à elle par la présence d'un alcool dextrogyre et de petites feuilles. Le linalol lévogyre, de qualité supérieure au linalol dextrogyre de même qu'au linalol synthétique ou à un quelconque autre ersatz, était jadis utilisé pour l'élaboration de produits de parfumerie courant. La variété productrice fut ainsi surexploitée pendant plus de 1 siècle (de 1875 à 1970). L'avènement de conditions économiques défavorables (le Brésil inondant le marché mondial avec ses productions dextrogyres de moindre qualité) tout autant que la forte raréfaction de l'espèce (un arrêté ministériel a récemment interdit son abattage), ont été des facteurs décisifs dans l'arrêt de son exploitation industrielle en Guyane Française (Linjouom, 2000).

II) Présentation et objectifs du stage

Le Bois de Rose représente encore pour la Guyane Française certains enjeux de développement (notamment sous la forme de petites plantations productrices de linalol naturel ou d'autres substances entrant dans la mise au point de termicides) mais surtout de conservation. Suite à l'importante diminution constatée des effectifs de cette espèce, les gestionnaires du milieu se sont posés un certain nombre de questions (Quelle est l'importance de la menace ? Quelle méthodologie adoptée pour la conservation de l'espèce ?) auxquelles la

partie scientifique tente d'apporter des éléments de réponse. Le CIRAD-Forêt, en accord avec ses partenaires (l'IRD et l'ONF), a ainsi choisi de bâtir une stratégie de conservation s'appuyant sur plusieurs thématiques, telle la caractérisation des populations d'*Aniba rosaeadora* à la fois sur un plan phylogénétique et phylogéographique, l'étude de la propagation ou encore la mise au point de la sylviculture de l'espèce. Cette stratégie vise la conservation *ex situ* dans un premier temps et la mise en place d'une parcelle conservatoire selon les principes d'élaboration des « cores collections ». Quant à l'approche *in situ*, elle ne pourra réellement se définir qu'une fois les populations naturelles mieux identifiées.

Les objectifs de ce stage sont de contribuer à cette stratégie de conservation :

- d'une part en analysant la structure génétique des populations résiduelles de Guyane Française au travers des génomes chloroplastique et nucléaire. Cette analyse nécessite au préalable la mise au point de marqueurs neutres (de type PCR-RFLP et RAPD) sur une espèce qui n'a encore jamais été travaillée du point de vue moléculaire ;
- d'autre part en sélectionnant, au niveau d'une parcelle conservatoire, des individus d'avenir sur la base de caractères phénotypiques liés à l'adaptation. Cela s'apparente à la création d'une « core collection », définie par Brown (1995) comme étant « un ensemble limité d'accessions provenant d'une collection de ressources génétiques, choisies pour représenter le spectre génétique de la collection entière ».

MATERIELS ET METHODES

I) L'espèce *Aniba rosaeadora*

Sujette à de nombreuses controverses entre botanistes, un flou taxinomique a longtemps entouré cette espèce et perdure encore aujourd'hui. La raison principale en est sans doute ses caractéristiques intrinsèques particulières. Appartenant à la famille des Lauracées, famille complexe s'il en est, elle présente des caractères archaïques (fleurs trimères, sépales et pétales peu différenciés, étamines foliacées) ainsi que nombre de caractères propres (6 étamines fertiles introrses, 3 étamines fertiles extrorses, absence de staminodes, long style, petit stigmate). Des caractères souvent ardu à déterminer mais également très variables entre individus d'une même espèce. D'une taille pouvant atteindre les 40 mètres, avec des contreforts peu développés, *Aniba rosaeadora* possède en outre de nombreuses parties odorantes parmi lesquelles l'écorce, le bois ou encore les fleurs. Le fût est gris, l'écorce jaune pâle et les fruits sont assimilés à des baies elliptiques. Son régime de reproduction est l'allofécondation et la dispersion des graines est de type barochore ou zoochore. Des graines qui restent rares puisque la floraison est irrégulière et n'est pas toujours suivie d'une fructification. Son aire naturelle couvre huit états du nord de l'Amérique du Sud (le nord du Brésil, la Guyane Française, la Colombie, le Venezuela, l'Equateur, le Guyana, le Surinam et le Pérou).

II) Les populations résiduelles : aspect pratique et méthodologie moléculaire

1) L'échantillonnage

La prospection s'est déroulée essentiellement sur la partie Nord de la Guyane Française, au niveau de zones géographiquement localisées et censées supporter des populations de Bois de Rose. Plus de 250 individus furent ainsi référencés sur treize sites mais seuls 84 d'entre eux – c'est à dire les arbres adultes, les autres n'étant que des descendants de ceux-ci - ont fait l'objet d'une analyse moléculaire ultérieure. Certains de ces sites ont une origine anthropique (ce sont des plantations) tandis que d'autres abritent des populations naturelles à effectifs parfois très réduits (se référer à l'annexe 1). Les densités d'individus sont très variables, de 4 arbres pour 150 hectares de terre ferme sur le site de Paracou à 1 arbre par hectare sur celui de Saül (qui n'a jamais été soumis à une exploitation intense). Le matériel végétal échantillonné est constitué de feuilles, choisies à la jumelle et récupérées au moyen d'une carabine.

2) L'extraction de l'ADN

Cette phase primordiale, réalisée sur des feuilles saines exemptes de nécroses ou autres attaques parasitaires, s'est déroulée selon le protocole expérimental défini par Bousquet *et al* (1990 ; se référer à l'annexe 2). Les solutions mères d'ADN obtenues sont dosées au fluorimètre TD-700 suivant le protocole à la coloration d'Hoescht préconisé par le fabricant. Elles sont ensuite diluées dans de l'eau distillée stérilisée afin de préparer des solutions filles. Manipulation technique qui d'une part permet d'initier des travaux avec des solutions à une même et unique concentration (en l'occurrence 2 ng/ μ l) et d'autre part de protéger l'ADN mère, protection non assurée s'il sert directement de base de travail. Les solutions mères sont ainsi conservées à -80°C pour une durée indéterminée.

3) L'analyse moléculaire

Dans le cadre de ce stage, les techniques moléculaires mises en œuvre pour l'étude du polymorphisme génétique sont la PCR-RFLP et la RAPD. Ces deux méthodologies demandent au préalable une amplification de l'ADN et donc la réalisation d'une PCR (Polymerase Chain Reaction) qui, de manière simplifiée, se déroule comme suit :

- l'ADN d'intérêt est initialement dénaturé à haute température (à 94°C) et passe ainsi d'un état double brin à un état simple brin ;
- de courtes séquences d'ADN dénommées amorces s'hybrident au niveau des séquences d'ADN simple brin qui leur sont complémentaires et permettent d'initier l'amplification. Les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ces amorces sont spécifiques de la méthodologie moléculaire employée ;
- la Taq Polymerase reconstruit finalement le brin complémentaire (à 72°C).

Ce cycle de 3 étapes est répété n fois, le nombre de fragments d'intérêt augmentant ainsi de façon exponentielle. La vérification de l'effectivité d'une PCR se fait par migration sur gel d'agarose de concentration 1,8 % dans lequel la molécule d'ADN électriquement chargée va évoluer par électrophorèse (la différence de potentiel appliquée étant de 110 volts). La révélation des gels se fait au Bromure d'ETHidium (BET) qui à l'intéressante propriété de s'insérer entre les bases de l'acide nucléique est de fluorescer sous lumière ultraviolette.

3.1) Les marqueurs moléculaires

L'idée qui est sous-entendue ici est celle de caractériser l'ADN nucléaire ou cytoplasmique, ceci reposant sur le fait qu'il s'agit de la structure qui porte toute l'information d'un individu et lui est donc totalement spécifique. Les marqueurs moléculaires sont le reflet direct des changements au niveau de l'ADN (Gepts, 1995). Le choix de tel ou tel marqueur se fait après réflexion et en considérant les qualités propres du marqueur (Santoni, 2000), le type d'information recherchée, le nombre d'échantillons à analyser, le budget, le temps imparti pour l'étude...(Chevallier, 1998).

3.1.1) La technique PCR-RFLP

Acronyme de « Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism », la PCR-RFLP est basée sur l'utilisation d'enzymes bactériens qui hydrolysent l'ADN au niveau de sites spécifiques, dits sites de restriction. Contrairement à la technique RFLP classique, seule une partie prédéterminée du génome est ici soumise à la digestion enzymatique. L'indispensable amplification initiale de l'ADN par la méthode PCR a conduit à tester 32 couples d'amorces dont les températures optimales d'hybridation ont été déterminées lors de la réalisation de gradients. Chaque amplification réussie est digérée par 5 enzymes de restriction (Alu 1, Bam H1, Taq 1, Hae 3, Hinf 1) à une température de 37°C pendant une durée minimale de 1 heure (hormis pour Taq 1 qui nécessite une température de 65°C). L'observation du polymorphisme généré lors de ces coupures se fait sur des gels de polyacrylamide à une concentration de 8% (la différence de potentiel considérée étant de 300 volts).

Dans le cadre de ce stage, cette technique va être appliquée au génome chloroplastique. Molécule stable, de petite taille et de forme circulaire, l'ADN chloroplastique jouit d'une transmission uniparentale, supposée maternelle chez les angiospermes. Ce mode d'hérédité limite l'adaptation rapide et l'hybridation intermoléculaire (d'après Palmer, 1987 ; cité par Bukhari *et al.*, 1999). En outre, la faible dispersion des graines, la faible taille efficace de la population (ce génome étant haploïde ; d'après Mitton, 1993, cité par Vendramin *et al.*, 1998) ainsi que la sélection de mutations favorables qui va indirectement sélectionner le reste du génome (tous les gènes étant liés) sont autant d'éléments qui vont conférer à cet ADN une forte structuration spatiale, idéale pour des études de phylogéographie. Comme cela a notamment été démontré chez l'Olivier (Amane *et al.*, 1998), la variabilité est moins importante au niveau intrapopulationnel qu'elle ne l'est au niveau interpopulationnel.

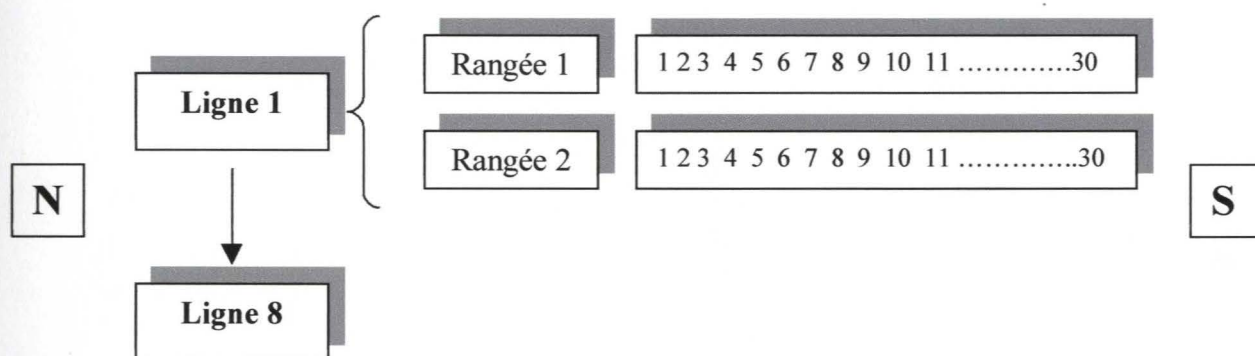
3.1.2) La technique RAPD

Acronyme de « Random Amplified Polymorphic DNA », cette méthodologie est l'une des nombreuses possibilités de la MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling), qui comprend toutes les techniques réalisant une PCR par utilisation d'amorces de séquences arbitraires (De Vienne, 1998). Les marqueurs obtenus sont de type « empreinte génétique » car ils permettent de révéler la présence ou l'absence d'un seul allèle pour chaque locus, cela pour un grand nombre de loci (Grivet et noyer, 1999). Méthode robuste et aisément applicable (Fritsch *et al.*, 1996), cependant limitée par des problèmes de dominance rendant caduque le calcul de fréquences alléliques (des hypothèses peuvent être faites pour pallier à ceci mais restent difficiles à vérifier ; Isabel *et al.*, 1995 ; Travis, 1996, cité par Moynot, 2000) ainsi que par des problèmes de reproductibilité, elle génère des marqueurs qui sont, à l'instar de la PCR-RFLP, très abondants et distribués à travers tout le génome.

Soixante couples d'amorces répartis en 3 opérons (W, X, Y) ont ainsi été testés. L'effectivité des PCR a été de nouveau vérifiée par migration sur gel d'agarose et révélation au BET. Les profils obtenus sont ensuite comparés entre eux et traduits sous forme d'un tableau de données binaires. Tableau ultérieurement traité par l'analyse factorielle, synthétisé également sous forme d'un arbre puis enfin soumis à l'analyse de variance.

III) La parcelle conservatoire : aspect pratique et cadre expérimental

Créée en décembre 2000 sur le site de Paracou, à 40 km au nord-ouest de Kourou, cette parcelle est constituée de jeunes plants issus de 5 populations résiduelles dont la contribution en terme d'effectif est très variable : 393 individus de la parcelle sont ainsi originaires d'Eskol, 40 d'Agelas, 25 de Cacao, 15 de Gabrielle et enfin 7 de Lysis. Ces individus sont répartis sur une surface rectangulaire d'environ 1 hectare et ce de façon à mêler leurs origines. Disposés à intervalles réguliers selon un axe nord-sud, ils définissent ainsi 8 lignes, ces dernières étant elles-mêmes subdivisées en 2 rangées de 30 individus chacune (se référer au schéma ci-dessous).



Cela fait donc un total de 480 plants qui ont chacun fait l'objet de mesures morphologiques et sanitaires, c'est à dire respectivement de mesures quantitatives et qualitatives. Alors que pour ces dernières il s'agissait essentiellement d'évaluer un état général prenant en compte l'aspect externe, la présence de nécroses ou encore la résistance à la cochenille, d'un point de vue morphologique le travail fut nettement plus diversifié. Différentes données furent ainsi collectées, telles la hauteur totale ou l'accroissement depuis le 31 janvier 2001 (les données qui intéressent ce stage ayant été prélevées au mois de mai 2001). Mais il fût également chercher à quantifier la ramification individuelle ainsi qu'à calculer un indice foliaire, défini comme étant le produit de la longueur moyenne des deux plus grandes feuilles par leur largeur moyenne. Afin de minimiser les effets d'échantillonnage, ce travail s'est déroulé sur un laps de temps relativement réduit et chaque type de mesure a été réalisé par une même et unique personne. Cet ensemble de données disparates est traité par l'analyse factorielle.

IV) L'analyse statistique

1) L'analyse factorielle

Les données obtenues, tant au niveau des populations naturelles marquées par la méthodologie RAPD que de la parcelle conservatoire, amènent à élaborer des tableaux

croisant des individus en lignes avec des variables quantitatives multimodales en colonnes. Ce genre de tableaux nécessite un traitement statistique particulier appelé Analyse Factorielle des Correspondances Multiples ou AFCM (traitement effectué par le logiciel Xlstat, développé par T. Fahmy ; Fahmy@Xlstat.com). Cet outil mathématique est basé sur la distance du Khi-deux qui possède les propriétés d'une distance euclidienne classique (Escofier *et al*, 1998) et qui est donc graphiquement représentable dans un plan factoriel.

Les éléments, individus ou variables, se trouvent initialement dans un espace à n dimensions, inexploitable en tant que tel. Il convient de ramener ce nuage d'éléments sur un espace plus aisément interprétable, bidimensionnel par exemple, tout en minimisant autant que faire se peut la perte d'information qui résulte de cette modification. De nouveaux axes factoriels sont ainsi construits et ce en respectant deux conditions, d'une part la minimisation du critère des moindres carrés et d'autre part l'orthogonalité (ce qui assure l'indépendance des axes). Le choix de tel ou tel plan de représentation se fait en fonction du pourcentage d'information qu'il contient, les plus informatifs étant par essence les plus intéressants. L'interprétation graphique se fera en fonction de la qualité de représentation d'un élément ou encore en fonction de sa contribution à l'inertie d'un axe. L'analyse factorielle permet d'avoir un aperçu global de la diversité contenu dans un tableau de données (Dervin, 1988) tout en limitant les perturbations générées par les effets ponctuels.

Pour les données RAPD, l'analyse factorielle est menée de manière classique et conduit à construire un Tableau Disjonctif Complet (TDC) dans lequel chaque variable est représentée par un certain nombre de modalités (2 dans le cas présent). De manière générale, pour une variable, un individu prendra la valeur 1 pour la modalité qu'il possède (en bleu dans le schéma ci-contre) et la valeur 0 pour les autres modalités. En ce qui concerne Les données issues de la parcelle conservatoire, du fait de leur hétérogénéité (de nature quantitative et qualitative), leur discrétisation doit précéder la construction du TDC. Certaines règles sont à respecter pour ceci :

	Variable 1				Variable 2				...
	a	b	c	d	a	b	c	d	
Individu 1	0	0	1	0	0	1	0	0	
Individu 2	0	1	0	0	0	0	1	0	
etc...									

- le nombre de modalités créées pour chaque variable ne doit être ni trop ni trop peu important. Ceci pour éviter respectivement de mettre en évidence des effets entre modalités qui ne sont que ponctuels et de regrouper au sein d'une même modalité des individus trop différents (ce qui conduit à une perte importante d'information) ;
- les modalités rares sont à proscrire car elles « attirent » à elles les axes factoriels ;
- les effectifs totaux de chacune des modalités doivent être proches, d'autant plus si ces modalités doivent être comparées.

La discrétisation à portée sur 5 variables (se référer à l'annexe 3) : l'accroissement (4 modalités), la hauteur (4 modalités), la surface foliaire (4 modalités), la ramification (3 modalités) et l'état sanitaire (2 modalités). Le nombre de modalités créées pour les 3 premières a été déterminé après la construction d'histogrammes. Les résultats obtenus par l'AFCM sur ces variables vont guider l'élaboration d'une « core collection », ceci par application de la « Principal Component Score Strategy » (ou PCSS ; Noirod *et al*, 1996). Cela revient à évaluer la contribution de chaque individu à la diversité totale, en sommant l'ensemble de ses coordonnées sur les axes factoriels et en divisant le résultat obtenu par la somme généralisée des carrés (soit le produit du nombre de lignes par le nombre de colonnes). L'obtention de toutes les diversités relatives permet d'établir une courbe des diversités relatives cumulées, ce qui autorise ensuite le choix des individus les plus représentatifs.

2) La représentation arborée

Complémentaire au précédent, cet outil statistique met plus en évidence les liens individuels que la diversité dans son ensemble. Basée sur le choix d'un indice de similarité adapté, la représentation arborée ne sera appliquée ici qu'aux seules données RAPD. Avec ce type de marqueur, les doubles présences sont autant informatives que les doubles absences et l'indice de similarité doit en tenir compte. Celui établi par Sokal et Michener (voir ci-dessous) paraît donc tout à fait convenir. L'ajout de contraintes à cet indice autorise sa représentation graphique sous forme arborée, soit en ultramétrie soit en distance additive. Cette dernière est par ailleurs considérée comme une extension de l'ultramétrie, donc moins contrainte et par-là même plus intéressante (Perrier *et al*, 1999).

Le nombre important d'individus participant à l'analyse mène à la construction d'une multitude d'arbres parmi lesquels il convient de trouver l'arbre vrai ou du moins celui qui s'en approche le plus. Dans cette

optique, l'utilisation d'une méthode de regroupement s'avère judicieuse ; celle choisie dans le cadre de ce travail est Neighbor-joining tree (NJTree), développé par Saitou et Nei en 1987. Algorithme itératif utilisant le critère du voisinage relatif (critère basé sur le principe de parcimonie, ce qui va conduire à la minimisation la longueur totale de l'arbre), cette méthodologie ascendante implique la distance additive d'arbre et permet de prendre en compte des taux d'évolution différentiels. Nombre de travaux scientifiques insistent sur l'efficacité de NJTree pour retrouver l'arbre vrai. L'arbre sera construit à l'aide du logiciel DARwin, développé par X. Perrier et JP. Jacquemoud-Collet (perrier@cirad.fr ; jacquemoud-collet@cirad.fr).

$$S_{ij} = (n_{1,1} + n_{0,0})/P$$

$$\text{avec } P = a + b + c + d$$

a = présences en commun

b = absences en commun

c = présences chez l'un et absences chez l'autre

d = inverse de c

3) L'analyse de variance

L'analyse factorielle et la représentation arborée n'étant somme toute que deux méthodes descriptives, il apparaît indispensable de compléter ces analyses par la puissance d'un vrai test statistique, tel l'analyse de variance. L'assertion initiale est que les populations actuelles de bois de Rose sont issues d'une unique population ancestrale répartie sur l'ensemble de la Guyane Française. Seule une partie des ces populations est aujourd'hui accessible, d'où le choix du modèle aléatoire de l'analyse de variance (voir ci-contre). Le test de cette hypothèse se fera au moyen du logiciel AMOVA (développé par M. Miller ; mpm2@nauvax.ucc.nau.edu), logiciel qui établit une comparaison entre la variance réelle des populations analysées et la variance obtenue lors de la permutation des

individus au sein de ces mêmes populations (Excoffier *et al*, 1992). Afin que le test soit valide, le nombre minimal de permutations doit être de 1000, la puissance du test augmentant avec le nombre de permutations. Dans le cas de figure où la variance aléatoire est supérieure à la variance réelle, la déduction résultante est l'acceptation de l'hypothèse H0 et donc

$$X_{ik} = m + A_i + D_{ik}$$

moyenne générale

écart factoriel

écart résiduel

L'hypothèse H0 testée est la suivante :

$$\sigma^2 A = 0$$

l'absence de structuration des populations testées. Seules les populations qui présentent un effectif suffisant (c'est à dire Eskol, Agelas, Ouanary, Cacao et Lysis) seront soumises à ce test statistique. Les résultats obtenus à partir de ces populations permettront de tirer des conclusions sur l'ensemble des populations.

RESULTATS

I) Structuration génétique des populations résiduelles

1) Estimation de la diversité chloroplastique par la méthode PCR-RFLP

Parmi les 32 couples d'amorces initialement testés, tous n'ont pas apporté les résultats escomptés. Sept couples qui ne généraient aucune amplification ont été abandonnés tandis que 11 autres l'étaient également parce que les fragments obtenus étaient trop petits, inaptes à une digestion ultérieure. Enfin, l'incapacité de certains enzymes à digérer certaines amplifications a conduit à l'abandon de 5 derniers couples. Ce sont donc finalement 9 couples qui ont été choisis pour être la base concrète de l'étude du polymorphisme chloroplastique (se référer à l'annexe 4). Il est à noter qu'ici le type de polymorphisme observé est dit d'insertion.

De nombreux problèmes ont été rencontrés lors de la mise au point de ces marqueurs. Seuls certains individus (parfois moins d'une vingtaine) ont pu être testés avec certaines amorces, ce qui n'a pas permis d'établir le tableau classique des chlorotypes (Boutte, 1999 ; Messier, 1998) ou de déterminer combien sont présents au niveau de ces populations.

Cependant, après une étude minutieuse des gels de migration, il en ressort tout de même que :

- le complexe Hae III/AS met en évidence la présence d'un chlorotype particulier à Lysis, chlorotype qui n'est cependant pas retrouvé chez tous les individus de cette population (se référer à l'annexe 5) ;
- le complexe AluI/K1K2 permet quant à lui d'isoler tous les individus de la population de Ouanary qui ont été testés puisqu'il y a là un chlorotype différent de ce qu'il est possible d'observer ailleurs (se référer à l'annexe 5).

En conclusion, il apparaît une certaine diversité chloroplastique au sein de l'espèce Bois de Rose en Guyane Française. Aucune structuration ni aucun dénombrement exhaustif des chlorotypes n'est cependant réalisable en l'état actuel de l'étude.

2) Estimation de la diversité totale par la méthode RAPD

Parmi les 60 couples d'amorces initialement testés, seuls ont été retenus ceux qui présentaient les profils de bandes les plus nets et les plus diversifiés, ce qui réduit à 9 leur nombre. Un certain nombre de bandes a été retenu pour chacun d'entre eux:

Amorce	W2	W5	X2	X3	Y7	Y13	Y15	Y17	Y18
Bandes	9	12	6	9	9	6	7	8	7

Après disjonction des données, les 73 bandes recensées vont conduire à élaborer un TDC croisant 146 colonnes (les variables) avec 84 lignes (les individus).

2.1) L'Analyse Factorielle des Correspondances Multiples

Une AFCM sur le TDC précédent indique de prime abord que les populations de Ouanary et de Saül se distinguent nettement des autres, cette dernière étant la plus éloignée. De plus, bien que les deux individus de Saül soient issus d'une même population, ils sont très différents entre eux (se référer à l'annexe 6, graphique 1). Techniquement parlant, cela se traduit par des profils de migrations qui se démarquent du lot commun. Cette structuration en groupes se retrouve dans une analyse plus pointue des résultats puisqu'il s'avère que les plans factoriels contenant de façon significative les populations de Ouanary et Saül (se référer à l'annexe 6, graphique 2) sont caractérisés par un pourcentage de diversité relativement élevé ; cela signifie qu'ils ont été construits en fonction de groupes bien distincts spatialement dans l'hyperplan.

Tant et si bien que ces deux populations biaisent l'étude du reste de l'analyse factorielle. Il s'avère ainsi judicieux de relancer une AFCM sans la population de Saül, puis également sans celle de Ouanary ensuite. Ce qui respectivement, d'une part, conduit à confirmer l'homogénéité de Ouanary qui forme un groupe bien délimité (se référer à l'annexe 7, graphique 1) et qui, d'autre part, permet d'observer la répartition des autres populations. Pour ces dernières, la tendance majeure est à l'absence de structuration (se référer à l'annexe 7, graphique 2). Il n'est en effet possible d'isoler aucun groupe, tout au plus certains individus d'une même population semblent se réunir tandis que d'autres de leurs congénères se trouvent graphiquement opposés. Ceci est valable pour toutes ces populations qui partagent donc de nombreuses bandes de migration.

2.2) La représentation arborée (se référer à l'annexe 8)

L'arborescence obtenue confirme les résultats de l'analyse factorielle, à savoir le positionnement excentré des populations de Ouanary et de Saül (celle-ci étant une nouvelle fois la plus éloignée en terme de pas évolutifs) et l'absence de structuration au sein des autres populations.

2.3) L'analyse de la variance

Le test a été réalisé avec 1000 puis avec 2000 permutations. Dans un cas comme dans l'autre, la variance entre les populations n'est pas nulle (la probabilité que la variance issue d'un échantillonnage aléatoire soit supérieure à la variance observée étant très faible). Ce qui signifie qu'une certaine structuration de la diversité est présente au sein des populations de cette espèce en Guyane Française, du moins dans la zone testée. De plus, les résultats précédents de l'AFCM sont confirmés, à savoir que la variabilité intrapopulationnelle est supérieure à la variabilité interpopulationnelle (ce qui est généralement le cas chez une espèce tropicale ; Alvarez-buylla *et al*, 1996) et que la population de Ouanary est relativement éloignée des autres, comme l'indique le tableau des distances ci-dessous :

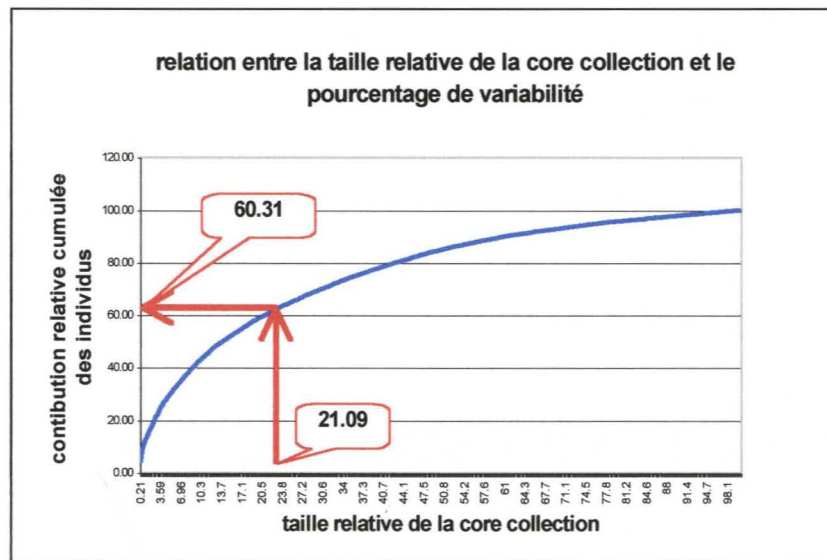
	Eskol	Agelas	Cacao	Lysis	Ouanary
Eskol	0.0000				
Agelas	0.0784	0.0000			
Cacao	0.1004	0.1110	0.0000		
Lysis	0.1694	0.1737	0.1029	0.0000	
Ouanary	0.4971	0.4865	0.4882	0.4914	0.0000

Il apparaît également que les plantations d'Eskol, d'Agelas et de Cacao sont très proches alors que celle de Lysis, certes à un degré moindre que Ouanary, s'en distingue quelque peu (et ce malgré une proximité géographique avec ces trois premières populations). Par simple curiosité, un test a été refait sans la population de Ouanary, avec 1000 et 2000 permutations également. Une nouvelle fois, il apparaît que la variance entre les populations n'est pas nulle, donc que la variabilité ne repose pas essentiellement sur Ouanary.

II) Création de la « core collection »

L'application de la méthode PCSS conduit à choisir les individus qui maximisent la diversité. Deux schémas directionnels peuvent être suivis : soit la « core collection » est bâtie par fixation du seuil de variabilité minimum qu'elle doit contenir (par exemple 50% de la diversité initiale), soit elle l'est par fixation d'un nombre d'individus minimum. La seconde approche sera considérée ici. En effet, la parcelle conservatoire est constituée de jeunes plants qui, en dehors de toutes perturbations externes, ne tarderont guère à se développer et à occuper de manière conséquente leur espace proche. Il est donc indispensable qu'une éclaircie soit faite dans la parcelle afin qu'ils ne se gênent pas les uns les autres. Dans le cas du Bois de Rose, il est prévu de laisser une surface d'au moins 100 mètres carrés à l'arbre adulte pour s'épanouir et fructifier abondamment (Bouvet, com. Pers.). La surface de la parcelle étant d'environ 10000 mètres carrés, ce sont donc 100 individus qui doivent être sélectionnés.

D'après la courbe ci-contre, il apparaît que choisir les 100 premiers individus, c'est à dire 21.09% de la collection initiale, équivaut à préserver 60.31% de la variabilité. Cependant, afin de s'affranchir de toute contrainte ultérieure de déplacement manuel des jeunes plants, déplacements qui ne sont jamais sans risques pour les intéressés, il est important que les



individus sélectionnés se répartissent de façon homogène sur la parcelle. Ce ne sont donc pas strictement les 100 premiers individus qui sont choisis mais plutôt les 100 premiers qui présentent le meilleur compromis variabilité/position spatiale. Après de telles considérations, il apparaît que les 100 premiers individus choisis permettent de conserver 58.45% de la variabilité initiale (se référer à l'annexe 9).

DISCUSSION

Les résultats obtenus précédemment, tant au niveau des populations résiduelles que de la parcelle conservatoire, permettent de répondre aux objectifs initialement fixés et de dégager des perspectives d'étude.

I) Les populations résiduelles

L'étude avec les marqueurs neutres montre l'existence d'une structuration génétique au sein des populations résiduelles de Bois de Rose au niveau guyanais (se référer à l'annexe 10). La population de Saül, et ce malgré le très faible effectif considéré ici qui ne permet pas de se rendre compte de la réelle singularité du pool de gènes, se caractérise pourtant par sa grande originalité génétique. Idem pour celle de Ouanary. Ceci est à relier au fait que ces deux populations soient géographiquement isolées. La plantation de Ouanary est en effet issue de peuplements naturels isolés par d'importantes zones marécageuses, ce qui limite d'autant plus les flux génétiques avec les populations du nord de la Guyane Française ; les individus de Saül sont quant à eux situés à plus de 300 km de la bande côtière et donc de la majeure partie des sites considérés dans cette étude. Au niveau de la plantation de Lysis, les résultats indiquent également la présence d'un pool génétique particulier, certes à un degré moindre que Ouanary ou Saül. Enfin, en ce qui concerne les plantations d'Agelas, d'Eskol et de Cacao, les résultats ont montré leur grande ressemblance génétique. Ce qui pourrait signifier qu'elles sont issues d'une seule et unique population naturelle ancestrale.

Ces remarques sur la différenciation entre les populations doivent être tempérées par ce qu'il convient d'appeler l'« effet plantation ». Le nombre de reproducteurs à l'origine de leur constitution n'est en effet pas connu. Il est tout à fait envisageable qu'une plantation soit issue de peu de reproducteurs, ce qui aurait pour conséquence, par simple effet d'échantillonnage, d'exagérer sa singularité. Elle pourrait apparaître plus distante qu'elle ne l'est réellement, partageant en fait plus de gènes avec les autres populations qu'initialement supposé. Des mutations ponctuelles sans grande répercussion sur la structuration ont peut-être ainsi été sélectionnées. Il ne faut pas non plus omettre le fait que les populations considérées ont des effectifs très variables, ce qui biaise les comparaisons. Il est par exemple probable qu'un chlorotype particulier est présent à Saül, mais l'étude ne portant que sur deux individus, cela n'a pu être mis en évidence.

Il n'est donc pas aisé de déterminer si les populations résiduelles sont représentatives de la variabilité des populations naturelles dont elles sont issues. Cependant, malgré cette inconnue sur le nombre de reproducteurs et les biais dans les comparaisons, il semblerait que certaines d'entre elles le soient. Cela apparaît après consultation de l'annexe 7 (graphique 2) où des plantations telles que Agelas, Eskol ou Cacao semblent bien s'interpénétrer avec les petits échantillons des populations naturelles de la même zone (tels Yiyi et Paracou).

La Guyane Française est un territoire relativement peu étendu (environ 1/6^{ème} de la superficie de la France) mais qui, comme il vient de l'être signalé, abrite des populations d'*Aniba rosaeodora* qui semblent bien différenciées. Il serait ainsi intéressant d'approfondir cette étude au niveau de l'aire naturelle en faisant de la phylogéographie mais également de la phylogénie afin de mieux comprendre le complexe d'espèce. Les marqueurs moléculaires permettront alors d'appréhender les flux de gènes à une autre échelle, aussi bien spatiale que temporelle (cela conduira à l'estimation de l'emplacement d'éventuels refuges pendant la dernière période glaciaire et à la détermination des routes de migrations post-glaciaires ; Dutech *et al*, 2000 ; King *et al*, 1998 ; Dumolin-lapègue *et al*, 1997).

Au niveau de la conservation elle-même, il faut noter que les risques de perdre l'espèce ne sont pas nuls, d'autant plus qu'elle pourrait se situer très en dessous d'un certain seuil démographique, couramment symbolisé par l'acronyme MVP (Minimum Viable Population). Il s'agit de la taille minimale autorisant la variabilité génétique suffisante pour la pérennisation d'une population dans le temps. Concrètement, c'est la quantité d'individus nécessaire à une population pour qu'elle ait 99 % de chance de survie après 1000 ans d'existence (www.nwfsc.noaa.gov). Ce nombre d'individus est variable compte tenu de la stochasticité environnementale, de probables changements de conditions extérieures et de la stochasticité démographique. La MVP est cependant un concept probabilistique et non un nombre fixé, qui peut être affecté par les événements génétiques, biologiques ou environnementaux (Managing global genetic resources, 1991). Il apparaît intuitivement que plus la population considérée sera importante, plus les chances de la voir se développer harmonieusement seront grandes. Ce qui prime donc avant tout pour une conservation *in situ* adéquate du Bois de Rose, c'est de préserver le maximum d'individus et le maximum de variabilité, dans un premier temps au niveau des populations résiduelles puis secondairement au niveau des populations naturelles.

II) La « core collection »

A l'instar des populations résiduelles, il convient d'être prudent quant aux conclusions qui vont être tirées ici. La parcelle conservatoire à l'origine de cette « core collection » a en effet été initialement bâtie à partir de 5 populations seulement sur les 13 connues et il s'ensuit un biais dans l'échantillonnage. De plus, l'appareillement des individus pose le problème de la consanguinité et de la fixation d'allèles délétères qui en résulte, toute reproduction ultérieure risquant alors de donner des descendants déficients.

Finalement, quel peut-être l'intérêt de cette « core collection » ? Bien qu'elle semble assez représentative de la variabilité existante du Bois de Rose en Guyane Française sur les caractères mesurés (comme l'atteste le calcul des coefficients de variation), son intérêt en l'état actuel de l'étude est assez minime car diminué par l'effet d'échantillonnage précédent. La conservation *ex situ* est cependant un concept incontournable, un complément à l'approche *in situ*, une sorte d'assurance contre une perte inopinée d'un matériel végétal. Cette conservation statique peut être l'ultime chance d'une espèce qui est fortement menacée par la destruction irrémédiable de son habitat (Geburek, 1997) ou par une surexploitation intense comme cela fut le cas pour le Bois de Rose. Elle s'impose d'elle-même lorsque la méthodologie *in situ* n'est pas viable, notamment lorsque la population est passée sous un certain seuil démographique et qu'elle ne peut plus être sécurisée (Managing global genetic resources, 1991). Afin de l'optimiser, la solution consisterait dans le cadre de cette étude à construire une « core collection » évolutive, c'est à dire éliminer les individus les moins intéressants, de préférence dans les groupes surreprésentés, et de compenser cette perte par un ajout d'individus provenant de nouvelles populations naturelles (ceci pour assurer un brassage des gènes et des origines). A condition bien évidemment que les populations n'aient pas trop divergées génétiquement et que les flux de pollen soient toujours possibles.

Avec la méthode PCSS, la redondance est fortement limitée car la colinéarité entre les variables est éliminée. Selon Hamon *et al* (1998), cette méthode est plus efficace pour échantillonner les allèles rares et donc maximiser la diversité globale lorsqu'elle est basée sur des données qualitatives moléculaires (et ceci d'autant plus que les effets au niveau quantitatif sont limités). Cependant, les auteurs soulignent le fait qu'il soit préférable de combiner les deux approches, à la fois qualitative et quantitative. En effet, chez une espèce autogame et possédant une structure marquée (ce qui est le cas pour le Bois de Rose qui est certes

allogame mais qui se caractérise par une discontinuité géographique et une structuration génétique assez forte), si la méthode PCSS est appliquée uniquement à des caractères quantitatifs, cela conduit à surreprésenter les allèles prédominants des groupes les plus diversifiés et à négliger les allèles rares. A l'inverse, l'utilisation exclusive de données qualitatives ne rend pas forcément compte du spectre de diversité morphologique existant au sein de l'espèce. Or, les données récoltées sur la parcelle conservatoire durant ce stage sont certes quantitatives et qualitatives, pour ces dernières néanmoins d'origine non-marqueurs. Ainsi, il serait intéressant de soumettre les individus de la dite parcelle à l'analyse moléculaire, par la méthodologie RAPD par exemple. Ceci permettrait de disposer d'un panel de résultats quantitatifs (ce qui sous-entend ici du polymorphisme sélectionné) et qualitatifs (ce qui sous-entend ici du polymorphisme neutre) sur lequel la méthode PCSS pourrait être appliquée.

Une autre stratégie d'échantillonnage, nommée « M », aurait également pu être considérée pour bâtir la « core collection ». Tendante à maximiser la rétention allélique, elle est très peu efficace par rapport à une autre stratégie (de type R, C, L...) lorsque les populations forment un pool reproductif continu et que les taux de migration sont forts. Elle aurait donc totalement satisfait aux exigences de ce travail puisque les populations de Bois de Rose ne sont guère en contact. Échantillonnant le maximum d'allèles neutres et non neutres (Bataillon *et al.*, 1996), son intérêt en conservation est très appréciable dans la mesure où elle permet de retenir les allèles répandus et peu fréquents ainsi que les allèles localisés et à haute fréquence (les plus importants en conservation selon Geburek, 1997), deux classes d'allèles à la base de l'adaptation locale.

Enfin, en terme de conservation, il faut souligner l'intérêt de mener de nouvelles études pour estimer les flux de gènes inter-populations ou inter-espèces. Cela renseignera sur la nécessité de créer des zones tampons autour de la parcelle conservatoire, ceci afin de conserver les caractéristiques de l'espèce et de prévenir toute pollution génétique. Les flux de pollen non désirés dans les populations gérées sont en effet un problème important pour les conservateurs (Geburek, 1997), car non seulement ils réduisent l'adaptation locale et la différenciation (Ellstrand *et al.*, 1993), mais ils sont surtout à l'origine de la création d'hybrides. Si les hybrides sont fertiles, il y a risque d'assimilation génétique alors que s'ils sont stériles, ils créent une dépression de consanguinité. Dans les deux cas, l'espèce peut être amenée à disparaître (Fritsch *et al.*, 1996). Ce problème est récurrent au niveau de la conservation *in situ* et est accentué par la rareté de l'espèce, ce qui est le cas du Bois de Rose. Les hybrides rentrent également en compétition avec les plantes parentes pour l'utilisation des ressources et leur résistance moindre à certains pathogènes peut conduire à une augmentation de la pression parasitaire sur l'ensemble du milieu (Soltis, 1999).

III) Polymorphisme neutre et polymorphisme sélectionné

Dans le cadre de ce travail faisant appel à aux marqueurs moléculaires neutres et aux caractères quantitatifs, il apparaît intéressant de prolonger la discussion sur la prise en compte de deux types de variabilité dans la conservation des ressources génétiques. Comme il vient de l'être signalé, il est nécessaire de se baser sur des caractères qualitatifs moléculaires ainsi que sur des caractères liés à l'adaptation pour sélectionner les individus, aussi bien en conservation *in situ* qu'en conservation *ex situ*. Eriksson (1995) souligne à ce sujet que les mesures métriques peuvent montrer de considérables variations par rapport aux marqueurs moléculaires, ces derniers reflétant l'histoire à long terme de la population alors que les premiers sont associés à l'adaptation et donc aux événements de sélection. La diversité

génétique est en fait un concept complexe et bipartite : la distinction se fait entre la diversité neutre d'une part (résultante d'un équilibre entre les processus démographiques et les processus générateurs de variabilité) et la diversité sélectionnée (transitoire ou maintenue) d'autre part (Godelle *et al.*, 1998). Les marqueurs moléculaires utilisés au cours de ce stage ont permis de travailler sur le polymorphisme neutre, considéré donc comme un enregistrement de l'histoire démographique des populations, ce qui rend par exemple possible la détection de goulots démographiques (voir par exemple Drummond *et al.*, 2000 ou encore Coates *et al.*, 1999) ou d'effets de fondation. Mais bien qu'il soit possible de caractériser les individus à leur niveau le plus intime, ces marqueurs ne permettent pas d'accéder au polymorphisme sélectionné ni d'estimer les caractères quantitatifs liés à la valeur sélective, résultat de la combinaison de plusieurs gènes.

En considérant le polymorphisme sélectionné, les caractères qui influencent la valeur sélective seront pris en compte et cela permettra une meilleure gestion des ressources actuellement disponibles. Il apparaît alors logique de se demander quelle peut-être l'utilité pour la conservation de faire une étude de structuration de populations basée sur des marqueurs neutres (Holsinger, 1996). Il semble qu'en fait un principe de précaution puisse légitimer leur utilisation. S'il est établi que la structuration sur marqueurs neutres ne reflète pas celle sur caractères adaptatifs, des événements semblables ont cependant pu conduire à l'instauration d'une structuration équivalente. Ce pourrait être le cas par exemple si l'hétérogénéité du milieu produisait une sélection différentielle et si les processus démographiques étaient favorables (flux négligeables, dérive locale prononcée) à une différenciation calquée sur celle du milieu. Dans le cas du Bois de Rose, ce sont néanmoins des hypothèses qui restent à vérifier.

Ainsi, il apparaît que de meilleurs résultats et une analyse plus fine seront obtenus par la combinaison de divers types d'informations. De même que la comparaison de l'ADN uniparental et biparental peut apporter de nombreux éclaircissements (Comes *et al.*, 2000), il est préférable de travailler avec différents marqueurs moléculaires (Carvalho, 1998), ou mieux encore de ne pas se baser uniquement ceux-ci. Geburek (1997) préconise par exemple d'accorder un poids équivalent dans l'analyse aux marqueurs moléculaires, biochimiques, morphologiques et autres données quantitatives.

IV) Perspectives de conservation *in et ex situ* pour le Bois de Rose

La conservation des ressources forestières n'est pas une entreprise aisée. Cela n'implique pas uniquement de prévenir leur extinction mais également d'en assurer la disponibilité pour l'avenir. La conservation se doit ainsi d'être dynamique mais se révèle par-là même particulièrement ardue puisqu'il ne s'agit donc pas de sauvegarder quelques gènes mais plutôt tout un processus évolutif complexe, la survie ultérieure dépendant d'allèles qui n'existent pas encore (Geburek, 1997). Du fait de l'évolution du système, les ressources génétiques actuelles doivent être considérées comme la base du développement futur et non pas comme un but à atteindre (Eriksson *et al.*, 1995).

Cependant, les contraintes à la conservation des ressources forestières sont multiples (Ouedraogo, 1998), de nature biologique (faible densité populationnelle, difficulté pour savoir si l'espèce est menacée - Ledig en 1993 parle d'« extinction secrète »-, nécessité d'avoir une infrastructure conséquente pour étudier ces géantes du monde végétal, maturité sexuelle et économique tardive...) ou même pratique (problème de récalcitrance rencontré en particulier chez les graines tropicales, connaissances limitées sur les espèces forestières et leur taxonomie, leur phénologie, le système de reproduction...). De plus, ces ressources jouissent

d'une grande diversité génétique qui être expliquée au travers de 7 paramètres (Hamrick *et al.*, 1992) : l'appartenance taxinomique, la région géographique, l'aire de répartition de l'espèce, le système de reproduction, la dissémination des graines, le mode de reproduction et le statut successional. Chacun d'entre eux doit au préalable être connu pour que la conservation soit la plus appropriée possible. *Aniba rosaeodora*, de la famille de Lauracées, souffre ainsi d'une méconnaissance sur nombre de ces paramètres (notamment sur tout ce qui concerne sa reproduction), ce qui par conséquent est un frein sérieux à toute entreprise scientifique. De plus amples recherches doivent être menées dans ce sens.

- **Synthèse des actions à entreprendre pour initier une conservation *in situ***

Localiser les populations naturelles est sans doute le défi majeur que devront relever les gestionnaires s'ils désirent conserver l'espèce Bois de Rose. En effet, il ne faut pas oublier que dans l'état actuel de leur taille, les plantations (qui représentent la majorité de la ressource connue) seront sujettes à la dérive génétique qui à son tour entraînera des effets de consanguinité et des effets démographiques. Il en résultera une diminution de la variabilité et de la valeur adaptative de l'espèce. Les populations allogames de Bois de Rose, contrairement aux espèces autogames qui sont le siège de purges alléliques, sont très vulnérables à cette dépression de consanguinité. De même, une petite population y est plus sensible qu'une population plus conséquente, résultat d'un équilibre entre la purge des allèles délétères par la sélection et la fixation aléatoire de ces mêmes allèles par une forte dérive génétique. La conservation *in situ* des populations résiduelles en l'état actuel ne pourra donc jamais être réellement efficace car elles sont destinées à disparaître. Cependant, cette approche est très intéressante et appréciée car elle permet le maintien des processus naturels, du potentiel évolutif et des capacités adaptatives des populations concernées. Cela autorise pareillement le maintien des liens ancestraux qui les unissent aux autres espèces, relations indispensables à leur intégrité génétique. Ici, ce ne seront donc pas seulement les gènes cibles qui seront conservés mais également les complexes de gènes co-adaptés de l'ensemble des espèces de la communauté. Une intervention humaine, notamment sur la reproduction future des individus, s'avère donc nécessaire pour pérenniser ce type de conservation et assurer un brassage des gènes. D'autres mesures doivent également être considérées :

- préserver prioritairement les populations résiduelles les plus différenciées, telles Saül et Ouanary. En ce qui concerne les autres populations qui forment un pool relativement homogène, il est peut-être inutile de s'atteler à les conserver toutes.
- retrouver les populations naturelles à l'origine des plantations et prospecter de nouvelles zones, tel le sud de la Guyane. Puis établir la structuration génétique des nouveaux individus échantillonnés, en utilisant notamment des marqueurs codominants et très variables tels les microsatellites (Sun *et al.*, 1999). Enfin, comme il l'a été signalé précédemment, il apparaît nécessaire d'étendre l'étude à toute l'aire naturelle de l'espèce.

- **Synthèse des actions à entreprendre pour initier une conservation *ex situ***

- en vertu du principe de précaution, il y a nécessité intégrer dans la « core collection » des individus issus de nouvelles populations ;
- considérer à la fois des caractères qualitatifs et des caractères quantitatifs liés à l'adaptation lors de la sélection des individus ;
- estimer les flux de gènes inter-populations ou inter-espèces.

BIBLIOGRAPHIE

- Alvarez-Buylla ER, Garcia-Barrios R, Lara-moreno C, Martinez-Ramos M (1996) *Demographic and genetic models in conservation biology : applications and perspectives for tropical rain forest tree species*. In : Ann. Rev. Ecol. Syst., pp. 387-421, vol 27.
- Amane M, Lumaret R, Hany V, Ouazzani N, Debain C, Vivier G, Deguilloux MF (1999) *Chloroplast-DNA variation in cultivated and wild olive (Olea europaea L.)*. In: Theor. Appl. Genet. 99, pp. 133-139.
- Bataillon TM, David JL, Schoen DJ (1996) *Neutral genetic markers and conservation genetics : simulated germplasm collections*. In: Genetics 144, pp. 409-417.
- Boutte C (1999) *Etude du polymorphisme de l'ADN chloroplastique de deux espèces tropicales : Monoroba coccinea L. et Symphonia globulifera L.* Mémoire de DEA, 20 pages, INRA Bordeaux-Cestas.
- Brown AHD (1995) *The core collection at the crossroads*. In : Core Collections of Plant Genetic Resources, pp. 3-19. IPGRI (ed. T Hodgkin, AHD Brown, ThJL van Hintum and EAV Morales).
- Bukhari YM, Koivu K, Tigerstedt PMA (1999) *Phylogenetic analysis of Acacia (Mimosaceae) as revealed from chloroplast RFLP data*. In: Theor. Appl. Genet 98, pp. 291-298.
- Carvalho GR (1998) *Molecular ecology : origins and approach*. Advances in Molecular Ecology, (ed. GR Carvalho), IOS press.
- Coates DJ, Hamley VL (1999) *Genetic divergence and the mating system in the endangered and geographically restricted species, Lambertia orbifolia Gardner (Proteaceae)*. In : Heredity 83, pp. 418-427.
- Comes HP, Abbott RJ (2000) *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and quantitative trait analyses across a major phylogeographical break in the mediterranean ragwort Senecio gallicus Vill. (Asteraceae)*. In : Molecular Ecology 9, pp. 61-76.
- Chevallier MH (1998) *Les marqueurs moléculaires*. In : vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique sub-saharienne, pp. 130-137. IPGRI (ed. Ouédraogo et al., Burkina Faso).
- Dervin C (1988) *Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle des correspondances ?* In: STAT-ITCF, INRA-INAPG.
- De Vienne D (1998) *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. 200 pages (ed. INRA)
- Drummond RSM, Keeling DJ, Richardson TE, Gardner RC, Wright SD (2000) *Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, Metrosideros bartlettii (Myrtaceae)*. In : Molecular Ecology 9, pp. 1149-1157.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ (1997) *Phylogeographic structure of white oaks throughout the european continent*. In : Genetics 146, pp. 1475- 1487.
- Dutech C, Maggia L, Joly HI (2000) *Chloroplast diversity in Vouacapoua americana (Caesalpiniaceae), a neotropical forest tree*. In : Molecular Ecology 9, pp. 1427-1432.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) *Population genetic consequences of small population size : implications for plant conservation*. In: Annu. Rev. Ecol. Syst. 24, pp. 217-242.
- Eriksson G, Namkoong G, Roberds J (1995) *Dynamic conservation of forest tree gene resources*. In : Forest Genetic Resources, No 23. FAO, Rome.
- Escoffier B, Pages J (1998) *Analyses factorielles simples et multiples : objectifs, méthodes et interprétation*. 284 pages (ed. Dunod).

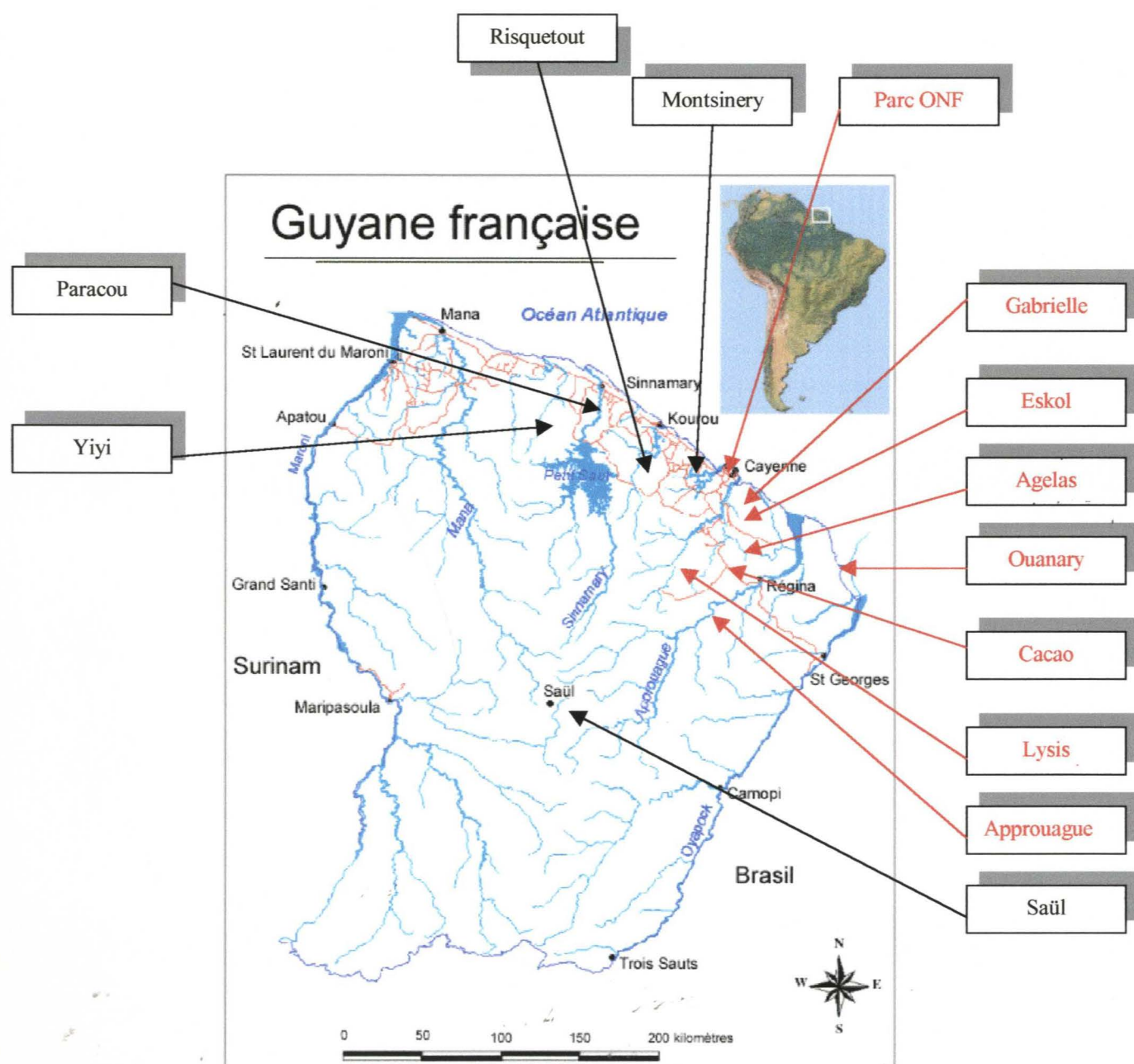
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data*. In: Genetics 131, pp. 479-491.
- Fritsch P, Rieseberg LH (1996) *The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics*. In: Molecular genetic approaches in conservation, pp. 54-73 (ed. TB Smith and B Wayne). Oxford University Press, New York.
- Geburek T (1997) *Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees*. In : Biodiversity and Conservation, pp. 1639-1654.
- Gepts P (1995) *Genetic markers and core collection*. In : *Core Collections of Plant Genetic Resources* (edited by T. Hodgkin, A.H.D. Brown, Th.J.L van Hintum and E.A.V Morales), pp. 127-146.
- Godelle B, Austerlitz F, Brachet S, Colas B, Cuguen J, Gandon S, Gouyon PH, Lefranc M, Olivieri I, Reboud X, Vitalis R (1998) *Système génétique, polymorphisme neutre et sélectionné : implications en biologie de la conservation*. In : Genet. Sel. Evol. 30 (Suppl.1), pp. S15-S28.
- Grivet L, Noyer JL (1999) *Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire*. In: Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. CIRAD, collection Repères, pp. 13-41, (ed. Hamon, Seguin, Perrier et Glazmann). 387 pages.
- Hamon S, Dussert S, Deu M et al. (1998) *Effects of quantitative and qualitative principal component score strategies on the structure of coffee, rubber tree, rice and sorghum core collections*. In: Genet. Sel. Evol. 30 (Suppl.1), pp. S237-S258. Inra/Elsevier, Paris.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) *Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species*. In : New Forests 6, pp. 95-124.
- Holsinger KE (1996) *The scope and the limits of conservation genetics*. In : Evolution, 50 (6) pp. 2558-2561
- Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J (1995) *Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce*. In : Evolution, pp. 6369-6373.
- King RA, Ferris C (1998) *Chloroplast DNA phylogeography of Alnus glutinosa (L.) Gaertn.* In : Molecular Ecology 7, pp. 1151-1161.
- Linjouom I (2000) *Conservation des ressources génétiques forestières, plan d'action pour la sauvegarde d'une espèce en voie de disparition, le Bois de Rose, Aniba rosaeodora, DUCKE*. Mémoire de DESS, Gestion des Systèmes Agro-Sylvo-pastoraux en zones tropicales, Université Paris XII.
- Managing global genetic resources-forest trees (1991) National Research Council, 213 pages. National Academy Press, Washington D.C.
- Messier C (1998) *Structuration spatiale du polymorphisme de l'ADN chloroplastique chez l'Angélique de Guyane*. Mémoire de DEA, 20 pages, INRA Bordeaux-Cestas.
- Moynot G (2000) *Organisation spatiale de la diversité génétique d'une espèce forestière camerounaise, le Sapelli (Entandrophragma cylindricum, SPRAGUE)*. Mémoire de DEA, 22 pages, CIRAD-Forêt.
- Noirot M, Hamon S, Anthony F (1996) *The principal component scoring : a new method of constituting a core collection using quantitative data*. In : Genet. Resources Crop Evol. 43, pp. 1-6.
- Ouedraogo AS (1998) *Conservation et utilisation des ressources génétiques forestières*. In : vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique subsaharienne, pp. 23-39. Burkina Faso, IPGRI.

- Perrier X, Flori A, Bonnot (1999) *Les méthodes d'analyse des données*. In : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. CIRAD, collection Repères, pp. 43-76, (ed. Hamon, Seguin, Perrier et Glazmann). 387 pages.
- Santoni S.(2000 ; non paru) *Les marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes*. Centre INRA de Montpellier, 31 pages.
- Soltis PS, Gitzendanner MA (1999) *Molecular systematics and the conservation of rare species*. In : Conservation Biology, vol. 13, No 3, pp. 471-483.
- Sun GL, Diaz O, Salomon B, von Bothmer R (1999) *Genetic diversity in Elymus caninus as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers*. In : Genome 42, pp. 420-431.
- Vendramin GG, Anzidei M, Madaghiele A, Bucci G (1998) *Distribution of genetic diversity in Pinus pinaster Ait. as revealed by chloroplast microsatellites*. In : Theor. Appl. Genet. 97, pp. 456-463.

ANNEXES

ANNEXE 1 : localisation des sites

Site	Lieu	Plantation	Nombre d'individus
1	Agelas	oui	18
2	Eskol	oui	17
3	Paracou	non	4
4	Cacao	oui	9
5	Lysis	oui	9
6	Approuague	oui	1
7	YiYi	non	2
8	Risquetout	non	3
9	Parc ONF	oui	5
10	Ouanary	oui	11
11	Saül	non	2
12	Montsinery	non	1
13	Gabrielle	oui	2



ANNEXE 2 : protocole d'extraction
(après modification du protocole établi par J. Bousquet et al., 1990)

- 200 mg de feuilles saines sont déposées dans un mortier contenant 2 ml de tampon d'extraction (CTAB 2x) ;
- ce matériel végétal est broyé dans ce mortier, sous azote liquide, puis transféré dans un micro-tube de 2 ml auquel 1400 µl de tampon d'extraction sont additionnés ;
- la solution obtenue est mise à incuber pendant 30 minutes à une température de 65°C, ceci sous agitation continue ;
- la déprotéinisation se fait par addition dans le micro-tube de 600 µl de dichlorométhane : chloroforme : octanol (25 : 24 : 1) et par homogénéisation lors d'une agitation douce ;
- l'ADN est isolé dans le surnageant après 15 minutes de centrifugation à 13000 tr/min et à une température de 20°C. Il est ensuite transféré dans un micro-tube de 2 ml ;
- l'ADN est précipité par addition de 1/10^{ème} du volume en acétate de sodium 3M ; le tout est ajusté à 2ml avec de l'isopropanol froid ;
- afin de permettre une précipitation optimale, la solution est homogénéisée et les micro-tubes sont laissés pendant une durée de 1 heure à une température de -20°C ;
- l'ADN est culotté par centrifugation à 6000 tr/min pendant 10 minutes et à une température comprise entre 0 et 4°C ;
- la phase liquide est éliminée et l'ADN rincé dans 1 ml d'éthanol à 75% par agitation ménagée et à température ambiante ;
- une dernière centrifugation est effectuée à 13000 tr/min entre 0 et 4°C pendant 15 minutes, puis la phase liquide est de nouveau éliminée ;
- enfin, le culot d'ADN est mis à sécher à l'évaporateur pendant 10 minutes, puis resuspendu dans une solution de 200 µl de TE (10mM de Tris HCl + 0.1mM d'EDTA).



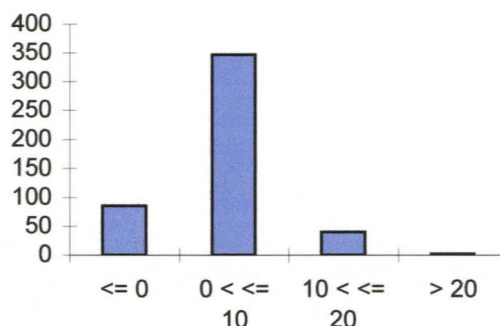
feuilles d'*Aniba rosaeodora* avant l'extraction

ANNEXE 3 : création de classes pour l'AFCM de la core collection

Accroissement		
Classe	Fréquence	Proportion
≤ 0	85	0,179
$0 < \leq 10$	347	0,732
$10 < \leq 20$	40	0,084
> 20	2	0,004

création de 4 classes

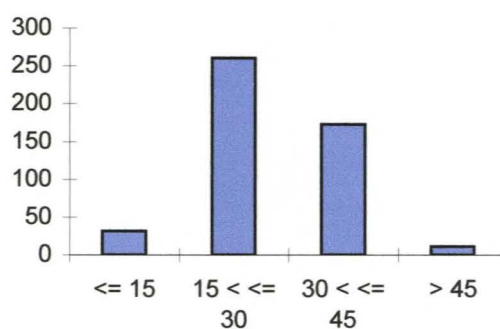
Histogramme des fréquences



Hauteur après 4 mois		
Classe	Fréquence	Proportion
≤ 15	31	0,065
$15 < \leq 30$	260	0,549
$30 < \leq 45$	172	0,363
> 45	11	0,023

création de 4 classes

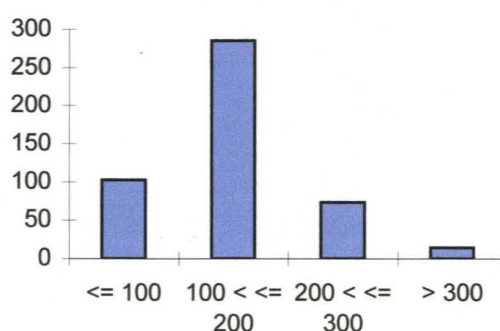
Histogramme des fréquences



Surface foliaire		
Classe	Fréquence	Proportion
≤ 100	102	0,215
$100 < \leq 200$	285	0,601
$200 < \leq 300$	73	0,154
> 300	14	0,030

création de 4 classes

Histogramme des fréquences



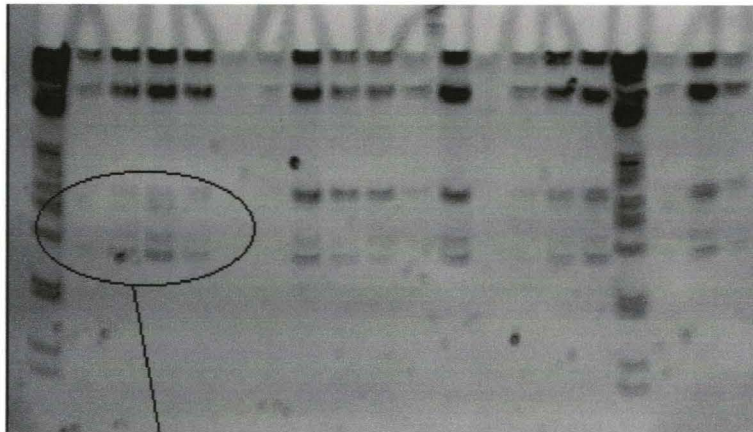
De plus, 3 classes ont été créées pour la ramification (absence de ramification, 1 ramification ou 2 ramifications) tandis que 2 l'ont été pour l'état sanitaire (état bon ou mauvais).

ANNEXE 4 : caractéristiques des amorces chloroplastiques

		T° d'hybridation	temps d'élongation (en mn)	poids théorique (en pb)	
RETENUES	HK	59	2	1831	Amorces retenues pour l'étude du polymorphisme
	K1K2	62	3	2585	
	CS	59	4	1612	
	B2B	57	3	2781	
	B1B2	51	2	1512	
	FV	52	4	3511	
	SR	53	2	1824	
	DT	49	2	1212	
	AS	63	4	3681	
NON-RETENUES	CD	51	4	3167	conditions non optimales pour une étude de diversité
	TC	45	3	2389	
	SFm	57	2	1254	
	ML	53	3	3005	
	BD	56	2	1618	
	LeLf	52	1	438	fragments amplifiés trop petits
	TbLb	51	1	773	
	LcLd	57	1	577	
	HA	53	1	495	
	QS3	59	1	602	
	SG	52	1	841	
	BF	53	1	853	
	QS1	td	1,5	599	
	QS2	td	1,5	602	
	r12-r20	53	1	884	
	Cp2u-	55	1	189	
	rbcl_orf	59	5	4307	absence d'amplification
	FmA	56 à 67	6	5104	
	TF	51	2	1754	
	VL	63	4	3850	
	ST	62	2	1386	
	KQ	65	4	3070	

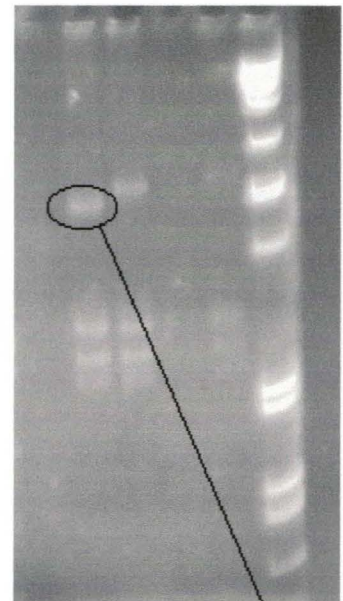
ANNEXE 5 : polymorphisme chloroplastique

K1K2 avec Alu I



polymorphisme de Ouanary :
tous les individus de la population
se démarquent

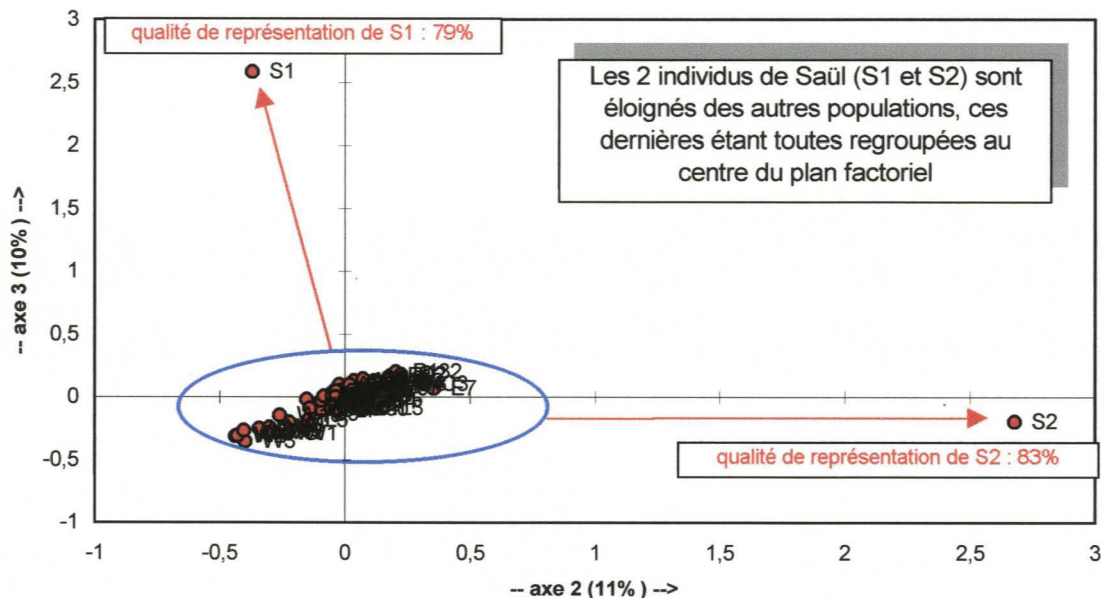
AS avec Hae III



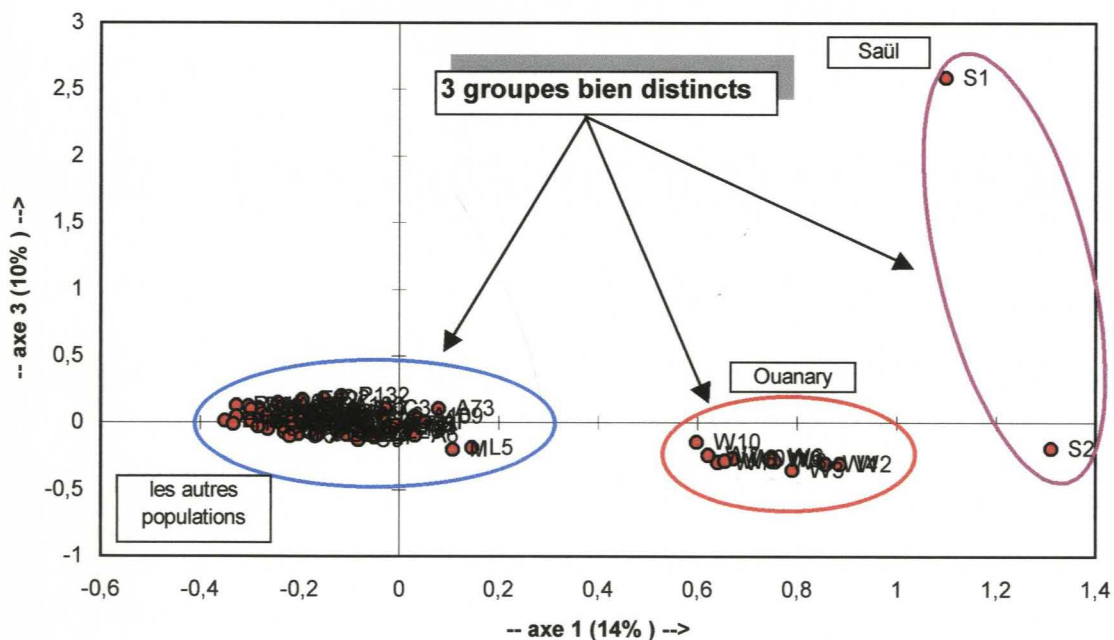
polymorphisme de Lysis :
seul un individu apparaît
différent

ANNEXE 6 : analyse factorielle des correspondances multiples

Graphique 1 : mise en évidence de la singularité de Saül (variabilité considérée : 21%)

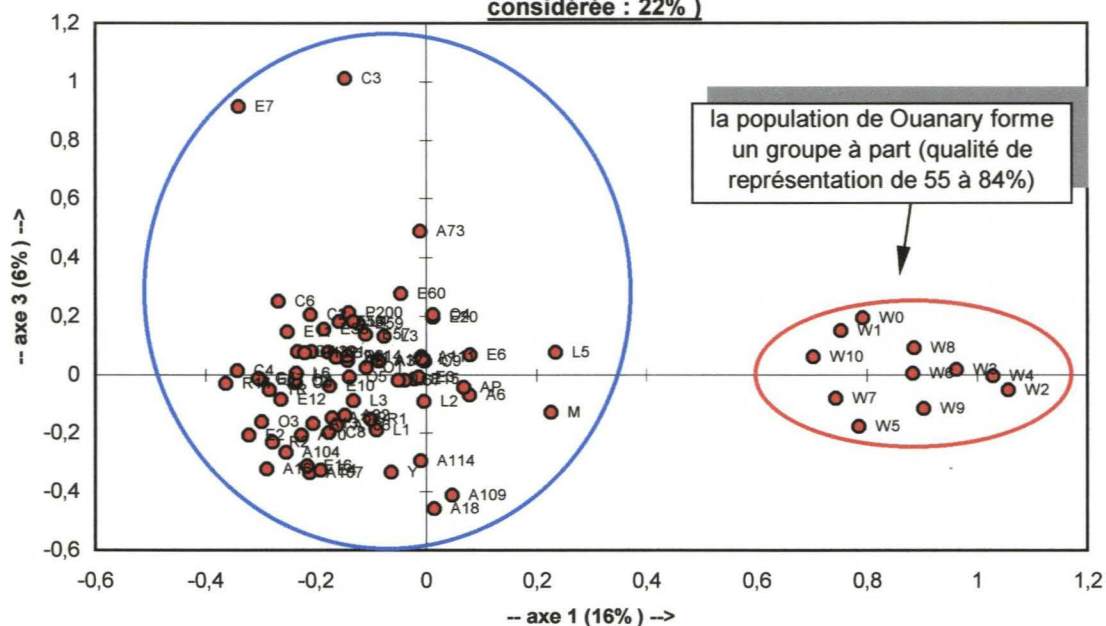


Graphique 2 : mise en évidence d'une structuration entre les populations (variabilité considérée : 24%)

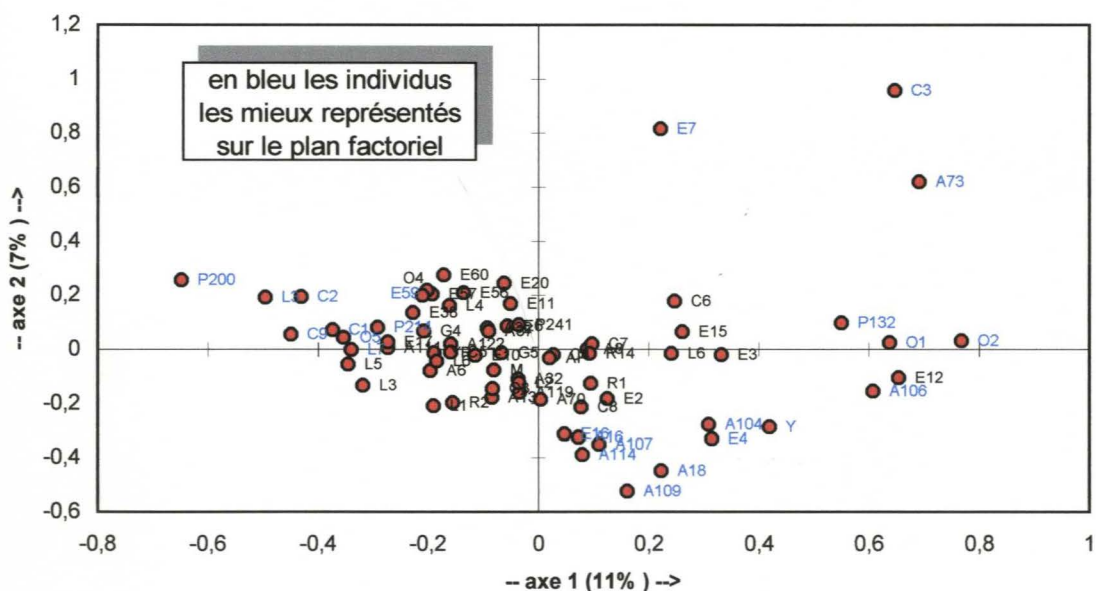


ANNEXE 7 : analyse factorielle des correspondances multiples

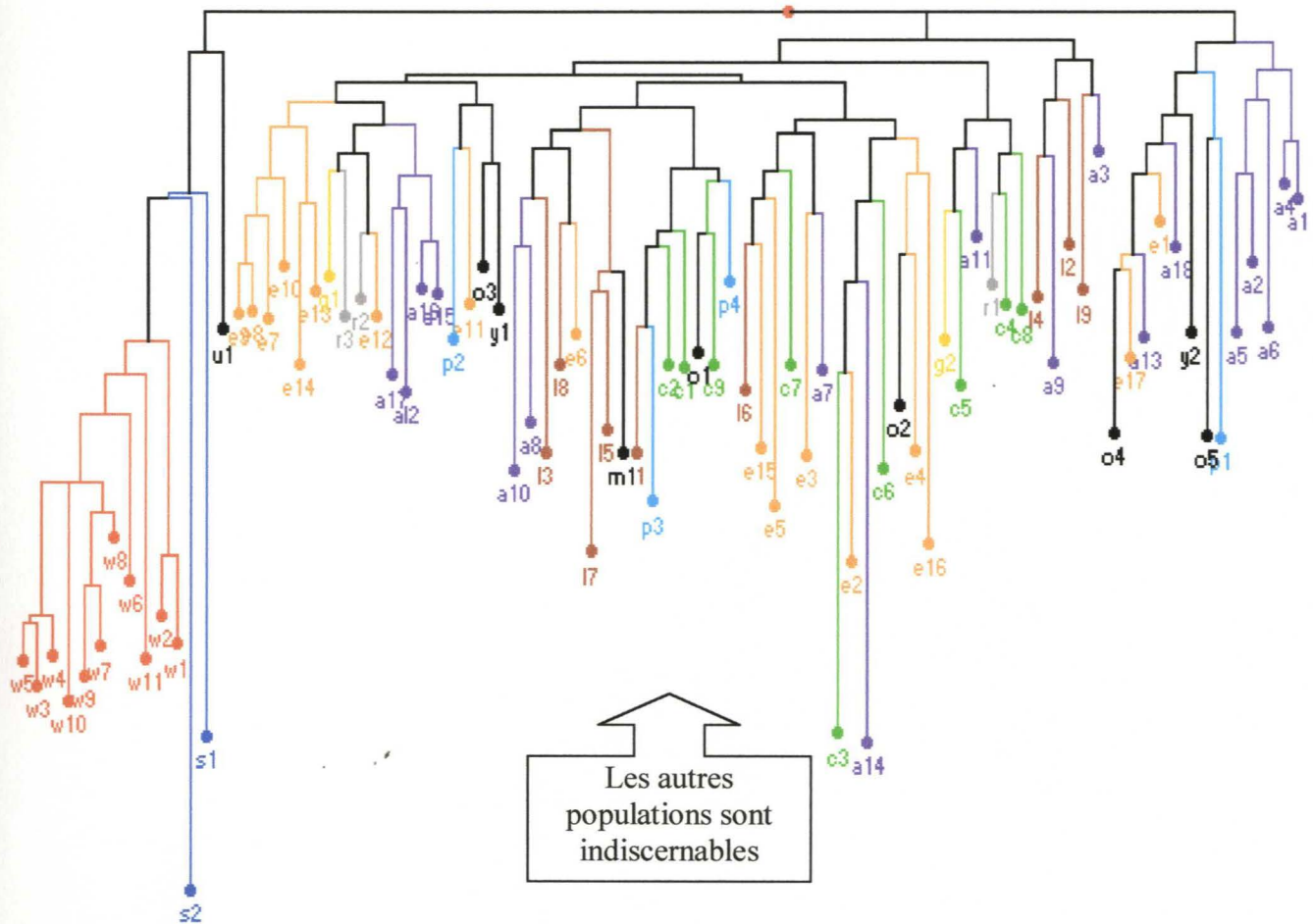
Graphique 1 : mise en évidence de la singularité de Ouanary (variabilité considérée : 22%)



Graphique 2 : mise en évidence d'une absence de structuration lorsque les populations de Saül et de Ouanary ne sont pas prises en compte (variabilité considérée : 18%)



ANNEXE 8 : représentation arborée



Ouanary en rouge
et Saül en bleu
forment deux
groupes distincts

Couleurs utilisées :

Bleu : Saül (s)
Bleu clair : Paracou (p)
Rouge : Ouanary (w)
Jaune foncé : Eskol (e)
Jaune clair : Gabrielle (g)
Violet : Agelas (a)
Vert : Cacao (c)
Gris : Risquetout (r)
Marron : Lysis (l)
Noir : Montsinéry (m), Approuague (u), Yiyi (y) et ONF (o)

ANNEXE 9 : choix des individus de la core collection

couleur rouge : les sélectionnés ; couleur noir : les non-sélectionnés

[illegible]

individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la core collection
1	4,55	0,00
2	8,68	0,00
3	10,44	0,01
4	11,77	0,01
5	12,95	0,01
6	14,12	0,01
7	15,29	0,01
8	16,46	0,02
9	17,49	0,02
10	18,47	0,02
11	19,45	0,02
12	20,42	0,03
13	21,39	0,03
14	22,37	0,03
15	23,34	0,03
16	24,28	0,03

individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la 1 ^{re} collection
17	25,11	0,04
18	25,94	0,04
19	26,77	0,04
20	27,43	0,04
21	28,10	0,04
22	28,76	0,05
23	29,43	0,05
24	30,07	0,05
25	30,67	0,05
26	31,27	0,05
27	31,86	0,06
28	32,46	0,06
29	33,05	0,06
30	33,63	0,06
31	34,20	0,07
32	34,77	0,07

individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la core collection
33	35,33	0,07
34	35,90	0,07
35	36,44	0,07
36	36,99	0,08
37	37,54	0,08
38	38,08	0,08
39	38,63	0,08
40	39,11	0,08
41	39,59	0,09
42	40,08	0,09
43	40,56	0,09
44	41,04	0,09
45	41,51	0,09
46	41,99	0,10
47	42,43	0,10
48	42,87	0,10

individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la 1 ^{re} collection
49	43,31	0,10
50	43,75	0,11
51	44,19	0,11
52	44,63	0,11
53	45,06	0,11
54	45,47	0,11
55	45,89	0,12
56	46,26	0,12
57	46,62	0,12
58	46,94	0,12
59	47,27	0,12
60	47,59	0,13
61	47,92	0,13
62	48,24	0,13
63	48,56	0,13
64	48,89	0,14

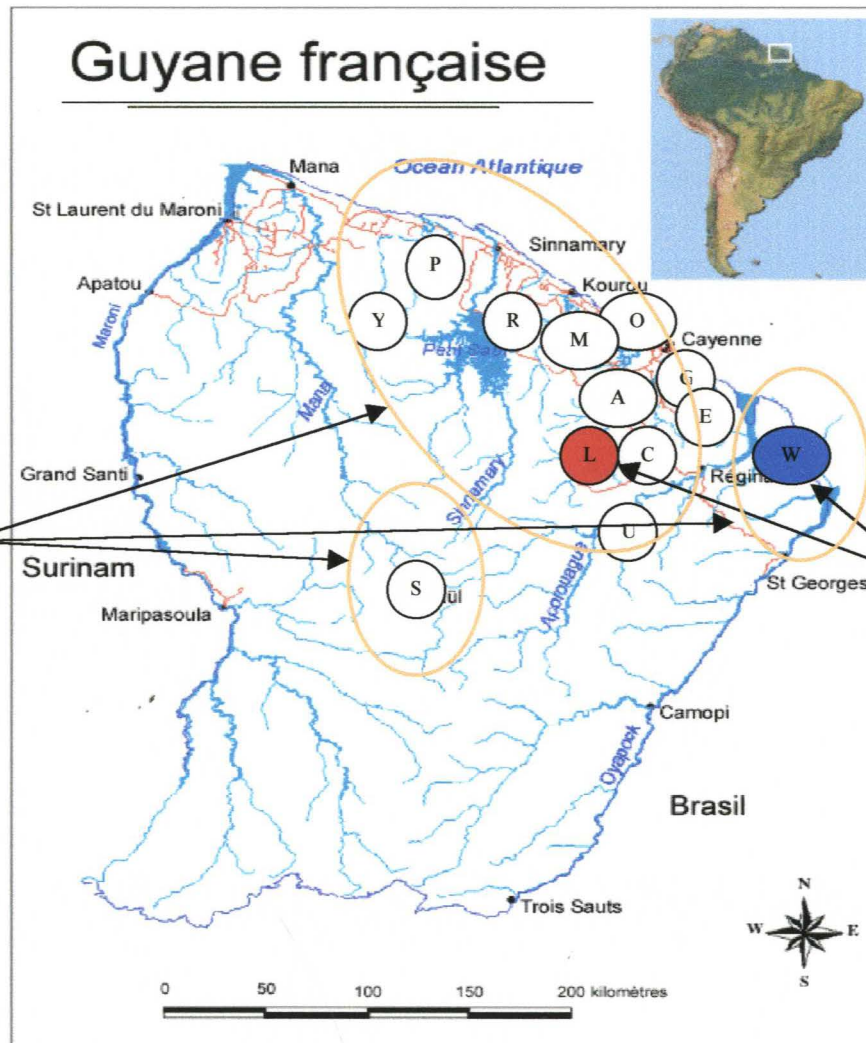
Individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la core collection
65	49,21	0,14
66	49,54	0,14
67	49,86	0,14
68	50,18	0,14
69	50,49	0,15
70	50,81	0,15
71	51,12	0,15
72	51,43	0,15
73	51,73	0,15
74	52,02	0,16
75	52,30	0,16
76	52,57	0,16
77	52,85	0,16
78	53,12	0,16
79	53,39	0,17
80	53,67	0,17

individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la core collection
81	53,94	0,17
82	54,20	0,17
83	54,45	0,18
84	54,70	0,18
85	54,95	0,18
86	55,20	0,18
87	55,45	0,18
88	55,70	0,19
89	55,94	0,19
90	56,19	0,19
91	56,44	0,19
92	56,69	0,19
93	56,92	0,20
94	57,15	0,20
95	57,37	0,20
96	57,58	0,20

individus	pourcentage de variabilité cumulé	taille relative de la core collection
97	57,80	0,20
98	58,02	0,21
99	58,24	0,21
100	58,45	0,21

ANNEXE 10 : structuration génétique du Bois de Rose en Guyane Française

Guyane française



Structuration des populations obtenue avec les RAPD

Deux chlorotypes qu'il a été possible de mettre en évidence